



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

SERIAL NO.)	10/031,152
APPLICANT)	Heinrich LEONHARDT
FILED)	20 March 2002
EXAMINER)	Christopher J. Nichols
ART UNIT)	1647
FOR)	TISSUE REGENERATING AGENT

16 January 2004

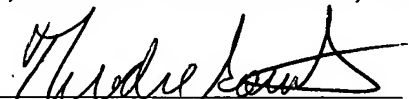
Hon. Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA
22313-1450

TRANSMITTAL OF CERTIFIED TRANSLATION OF PRIORITY DOCUMENT

SIR:

The applicant submits herewith a certified English language translation priority application DE 199 33 089.1 filed in the German Patent Office on 15 July 1999. Entry into the file wrapper is solicited.

Respectfully submitted,
NORRIS, McLAUGHLIN & MARCUS, PA

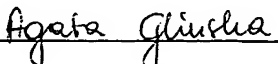
By 
Theodore Gottlieb
Reg. No. 42, 597

220 East 42nd Street - 30th Floor
New York, New York 10017
Tel.: (212) 808-0700
Fax: (212) 808-0844

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that the foregoing Transmittal of Priority Document is being deposited with the United States Postal Service as express mail, in an envelope addressed to:, Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date indicated below:

Date: 16 January 2004

By 
Agata Glinska

Patentanwalt
Dr. F. Baumbach
Robert-Rössle-Str. 10

D-13125 Berlin

Certificate

I, Patent Attorney Dipl.-Chem. Dr. Friedrich Baumbach

declare that I am competent in the German and English languages and I do hereby certify, that the annexed document is the best of knowledge and belief true and correct translation of the

German priority application 199 33 089.1

Filing Date: 15 July 1999

Declared at Berlin

this 16 day of January 2004



Patent Attorney Dr. F. Baumbach

Tel.: +49-30-94892273
+49-30-94892274
Fax: +49-30-94892271

Bankverbindung : Berliner Sparkasse
BLZ: 10050000
Kto.-Nr. 1953238820



Tissue regenerating agent

The invention relates to a tissue regenerating agent. The fields of application of this agent are medicine and the pharmaceutical industry.

A number of human tissues and organs essentially comprise terminally differentiated cells. These include, inter alia, the nerve cells of the brain and the cardiomyocytes of the heart. These cells are terminally differentiated, i.e. they no longer divide and cannot be induced to proliferate. This means that damaged or even dead cells cannot be replaced by proliferating, neighbouring cells, for example as in the healing of a wound. If, for example, in a blockage of the coronaries, cardiomyocytes are not sufficiently supplied with oxygen (heart infarct), the affected cells die off and are not replaced by new cardiomyocytes, but by fibrotic tissue, which can lead to drastic impairments of the function of the cardiac muscle. These coronary heart diseases are one of the most frequent diseases of the heart.

At present, there are no possibilities of therapy directly treating the causes, but merely attempts to limit the consequences of a heart attack. In severe cases, only a heart transplantation remains as the last resort. The objective of this invention is now to induce terminally differentiated cells to divide again, with the result that they can contribute to the regeneration of damaged, neighbouring tissue.

In principle, terminally differentiated cells can be induced to proliferate by tumour viruses. However, this unfortunately results in an irreversible transformation of the cells, i.e. a terminally differentiated and functioning cardiomyocyte is mutated into a cancer cell which grows uncontrolled, and in addition has lost the cardiac muscle

function. This approach is therefore not suited for therapeutic purposes.

Recently, a viral protein, VP22 from Herpes Simplex, has been described, which is exported from infected cells and taken up by neighbouring cells. The precise mechanism is not yet known. However, the transport process is independent of direct cell-to-cell contacts. Other proteins can also be transported when fused with the viral protein (Elliott G and O'Hare P (1997) Intracellular trafficking and protein delivery by a herpes virus structural protein. Cell 88: 223-233).

The objective of the invention is to provide a novel agent for the regeneration of tissue. It is based on the task of producing a fusion protein which induces the cells of damaged tissue to temporarily proliferate, thus effecting the regeneration of the tissue.

This task is solved in the measures portrayed in the claims.

The inventive tissue regenerating agent comprises an agent containing a fusion protein derived from a protein or a peptide sequence effecting the uptake in the cells, and a protein that induces the proliferation of cells. Preferably, a fusion protein derived from the viral VP22 protein with the SV40 T-antigen is used. On the basis of its varied functions, which cause cell proliferation and prevent apoptosis, the SV40 T-antigen is particularly well suited for this task. As an alternative, T-antigen related proteins or viral cyclins can be used. These cyclins include the K and V cyclins of the herpes virus. These cyclins are not inhibited by the cell cycle inhibitors of the cell and can thus induce proliferation without being impeded.

The second part of the task entails only temporarily inducing proliferation. After a few cell cycles, the cells are to return to the original terminally differentiated status and exercise their actual function. This task is solved with the inventive agent in that the agent is a protein which cannot replicate itself and is degraded by proteolytic enzymes. The stability of the fusion protein can be artificially amended as required by the inclusion of stabilising or destabilising peptides. This approach thus avoids irreversible genetic alterations and transformations of the cell, which would occur in DNA-based methods.

The use of this agent is done according to its purpose for regeneration of infarct-damaged cardiac tissue and for regeneration of nerve tissue damaged by injuries or disease. The agent is injected into the damaged areas and there taken up by the neighbouring cells. These cells are induced to proliferate, replace the dead cells and thus effect the tissue regeneration.

The agent is further also used according to its purpose for cultivation of terminally differentiated cells. Although terminally differentiated cells, e.g. nerve cells and cardiomyocytes, can be cultivated ex vivo, they do not proliferate and cannot be expanded for re-implantation or research purposes. The inventive agent is taken up by the cells following insertion into the culture medium and then effects the proliferation, i.e. multiplication of these cells. The dosage and duration of the treatment can be stipulated as required. After application of the agent has been stopped, the cells differentiate again and can either be re-implanted or used for research purposes.

It has been shown that the inventive agent can induce the S phase in terminally differentiated skeletal muscle cells (myotubes).

The invention is to be illustrated on the basis of a concrete example.

Example of implementation

The VP22 (UL49) gene is amplified with PCR from the Herpes Simplex Angelotti virus strain with primers which flank the open reading frame and remove the stop code. BamHI and XmaI restriction sites are added to the ends of these primers; with them, the PCR product can be cloned directly into an expression vector (pEVRF, Matthias et al., 1989). The T-antigen gene is amplified analogously from the SV40 DNA by means of PCR, and a XmaI and a XbaI restriction sites are added to the primers used. The PCR product is thus inserted into the expression vector at the C-terminal end of the VP22 gene. In the final cloning step, an oligonucleotide coding 6 histidine residues (His tag) and a stop codon is inserted at the C-terminal end of the T-antigen gene at the XbaI position. The final product is a fusion gene comprising the VP22 gene, the T-antigen and a His tag. The fusion gene is transcribed from the CMV promoter of the expression vector and translated from the translation signal of the Tk gene.

This expression vector is used to transfect COS-7 cells as described (Leonhardt et al., 1992). The fusion protein is exported from the producing cells into the medium due to the transport properties of VP22. The culture medium of the transfected COS cells conditioned in this way is continuously pumped via an affinity column (TALON, Clontech, Palo Alto, USA), which specifically binds the fusion proteins with a histidine tag. These affinity columns are used according to the instructions from the manufacturer. The fusion protein can then be eluted specifically with Imidazol and further purified by means of FPLC (ion exchange columns). The purified fusion protein is dialysed against normal saline solution and applied via catheters

directly into the cardiac muscle via the coronary arteries. As an alternative, the fusion protein can be injected directly and locally into the ischaemic cardiac muscle tissue.

Literature

Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88: 223-233

Leonhardt H, Page AW, Weier HU et al (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell 71: 865-873

Matthias, P, Müller M M, Schreiber E, Rusconi, S and Schaffner, W. (1989) Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. Nucl. Acids Res. 17, 6418

Patent Claims

1. Tissue regenerating agent comprising a fusion protein derived from a protein or a peptide sequence which effects uptake in cells and comprising a protein inducing the proliferation of cells.
2. Tissue regenerating agent comprising a fusion protein derived from the viral protein VP22 with a protein inducing the proliferation of cells.
3. Tissue regenerating agent comprising a fusion protein derived from a protein or a peptide sequence that effects uptake in cells, with the SV40 T-antigen.
4. Agent according to Claim 1, comprising a fusion protein derived from the viral protein VP22 with the SV40 T-antigen.
5. Agent according to Claim 1, comprising a fusion protein derived from the viral protein VP22 with a viral cyclin.
6. Use of the agent according to Claims 1-5 for regeneration of cardiac tissue damaged by an infarct.
7. Use of the agent according to Claims 1-5 for regeneration of nerve cells.
8. Use of the agent according to Claims 1-5 for cultivation of terminally differentiated cells.
9. Use of the agent according to Claim 8 for ex vivo cultivation, for example of cardiomyocytes with subsequent re-implantation.



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

SERIAL NO.)	10/031,152
APPLICANT)	Heinrich LEONHARDT
FILED)	20 March 2002
EXAMINER)	Christopher J. Nichols
ART UNIT)	1647
FOR)	TISSUE REGENERATING AGENT

16 January 2004

Hon. Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA
22313-1450

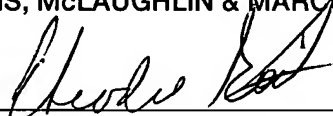
TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

SIR:

The applicant submits a certified copy of DE 199 33 089.1 filed in the German Patent Office on 15 July 1999. Entry into the file wrapper is solicited.

Respectfully submitted,
NORRIS, McLAUGHLIN & MARCUS, PA

By


Theodore Gottlieb
Reg. No. 42, 597

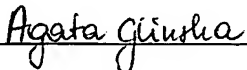
220 East 42nd Street - 30th Floor
New York, New York 10017
Tel.: (212) 808-0700
Fax: (212) 808-0844

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that the foregoing Transmittal of Priority Document is being deposited with the United States Postal Service as express mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date indicated below:

Date: 16 January 2004

By



Agata Glinska

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 33 089.1

Anmeldetag: 15. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE
MEDIZIN, Berlin/DE

Bezeichnung: Mittel zur Gewebsregeneration

IPC: A 61 K 38/16

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Februar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

W ihmayr



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Gewebsregeneration. Anwendungsgebiete dieses Mittels sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein neues Mittel zur Gewebsregeneration bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein Fusionsprotein aufzubauen, welches Zellen aus geschädigten Geweben vorübergehend zur Proliferation anregt und damit die Gewebsregeneration bewirkt.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Gewebsregeneration umfaßt ein Mittel enthaltend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, und einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein. Bevorzugt ist ein Fusionsprotein aus dem viralen VP22 Protein mit dem SV40 T-antigen.

Anmelder: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Erfinder: Dr. H. Leonhardt, Dr. M. Cardoso

Mittel zur Gewebsregeneration

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Gewebsregeneration. Anwendungsgebiete dieses Mittels sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Mehrere Gewebe und Organe des Menschen bestehen im wesentlichen aus terminal differenzierten Zellen. Hierzu zählen unter anderem die Nervenzellen des Gehirns und die Kardiomyozyten des Herzens. Diese Zellen sind terminal differenziert, d.h. teilen sich nicht mehr und können auch nicht zur Proliferation angeregt werden. Dies bedeutet, daß beschädigte oder gar abgestorbene Zellen nicht durch proliferierende, benachbarte Zellen, wie zum Beispiel bei der Wundheilung, ersetzt werden können. Wenn z. B. bei einer Verstopfung der Koronarien Kardiomyozyten nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (Herzinfarkt), sterben betroffene Zellen ab und werden nicht durch neue Kardiomyozyten, sondern durch fibrotische Gewebe ersetzt, was zu dramatischen Funktionseinschränkungen des Herzmuskels führen kann. Diese koronaren Herzerkrankungen (KHK) sind eine der häufigsten Erkrankungen des Herzens.

Derzeit gibt es keine Therapiemöglichkeiten, die direkt die Ursachen behandeln, sondern nur Versuche, die Folgen des Herzinfarktes zu begrenzen. Bei schweren Fällen bleibt als letzte Option nur noch die Herztransplantation. Ziel dieser Erfindung ist es nun, terminal differenzierte Zellen wieder zur Teilung anzuregen, so daß sie zur Regeneration von geschädigtem, benachbarten Gewebe beitragen können.

Prinzipiell können terminal differenzierte Zellen durch Tumerviren zur Proliferation angeregt werden. Dabei kommt es aber leider zu einer irreversiblen Transformation der Zellen, d.h. eine terminal differenzierte und funktionstüchtige Kardiomyozyte wird dabei zu einer unkontrolliert wachsenden Krebszelle mutiert, die zudem die Herzmuskelfunktionen verloren hat. Dieser Ansatz ist daher für therapeutische Zwecke nicht geeignet.

Kürzlich wurde ein virales Protein, VP22 aus Herpes Simplex, beschrieben, das von infizierten Zellen exportiert und von Nachbarzellen wieder aufgenommen wird. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Der Transportprozess ist jedoch unabhängig von direkten Zell-Zell-Kontakten. Mit dem viralen Protein können auch angehängte Fremdproteine transportiert werden. (Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88: 223-233).

A Die Erfindung hat das Ziel, ein neues Mittel zur Gewebsregeneration bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein Fusionsprotein aufzubauen, welches Zellen aus geschädigten Geweben vorübergehend zur Proliferation anregt und damit die Gewebsregeneration bewirkt.

● Diese Aufgabe wird mit den in den Ansprüchen dargestellten Maßnahmen gelöst.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Gewebsregeneration umfaßt ein Mittel enthaltend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, und einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein. Bevorzugt ist ein Fusionsprotein aus dem viralen VP22 Protein mit dem SV40 T-antigen. Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen, die die Zellproliferation erzwingen und Apoptose verhindern, ist das SV40 T-antigen besonders für diese Aufgabe geeignet. Alternativ können T-antigen verwandte Proteine oder virale Zykline verwendet werden. Zu diesen

Zyklinen zählen die K- und V-Zykline des Herpesvirus. Diese Zykline werden nicht durch die Zellzyklusinhibitoren der Zelle inhibiert und können damit ungehindert die Proliferation induzieren.

Der zweite Teil der Aufgabe besteht darin, nur vorübergehend eine Proliferation zu induzieren. Nach wenigen Zellzyklen sollen die Zellen in den terminal differenzierten Ausgangszustand zurückkehren und ihre angestammte Funktion ausüben. Diese Aufgabe wird mit dem erfindungsgemäßen Mittel dadurch gelöst, daß das Mittel ein Protein ist, das sich nicht replizieren kann und von proteolytischen Enzymen abgebaut wird. Die Stabilität des Fusionsproteins kann künstlich durch den Einbau von stabilisierenden oder destabilisierenden Peptiden nach Bedarf verändert werden. Dieser Ansatz vermeidet damit irreversible genetische Veränderungen und Transformationen der Zelle, die zwangsläufig bei DNA-basierten Methoden auftreten würden.

Die Verwendung dieses Mittels erfolgt bestimmungsgemäß zur Regeneration von infarktgeschädigtem Herzgewebe und zur Regeneration von verletzungs- oder krankheitsgeschädigtem Nervengewebe. Das Mittel wird in die geschädigten Bereiche injiziert und dort von den benachbarten Zellen aufgenommen. Diese Zellen werden zur Proliferation angeregt, ersetzen die abgestorbenen Zellen und bewirken somit die Gewebsregeneration.

Das Mittel wird weiterhin auch bestimmungsgemäß zur Kultivierung von terminal differenzierten Zellen eingesetzt. Terminal differenzierte Zellen, wie z.B. Nervenzellen und Kardiomyozyten, können zwar ex vivo kultiviert werden aber sie proliferieren nicht und können damit nicht zu Reimplantations- oder Forschungszwecken vermehrt werden. Das erfindungsgemäße Mittel wird nach Zugabe zu dem Kulturmedium von den Zellen aufgenommen und bewirkt dann die Proliferation, d.h. Vermehrung dieser Zellen. Dabei kann je nach Bedarf die Dosierung und Zeitdauer der Behandlung

bestimmt werden. Wenn das Mittel wieder abgesetzt wird, differenzieren die Zellen wieder und können entweder reimplantiert oder zu Forschungszwecken eingesetzt werden. Es wurde gezeigt, daß das erfindungsgemäße Mittel in terminal differenzierten Skelettmuskelzellen (Myotuben) S-Phase induzieren kann

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Das VP22 (UL49) Gen wird mit PCR aus dem Herpes Simplex Virusstamm Angelotti mit Primern amplifiziert, die den offenen Leserahmen flankieren und das Stopcodon entfernen. An den Enden dieser Primer werden BamHI und XmaI Restriktionsstellen angefügt, mit denen das PCR-Produkt direkt in einen Expressionsvektor (pEVRF, Matthias et al., 1989) kloniert werden kann. Das T-antigen Gen wird analog mittels PCR aus der SV40 DNA amplifiziert. Bei den verwendeten Primern wird jedoch eine XmaI und eine XbaI Restriktionsstelle angehängt. Das PCR-Produkt wird damit in den Expressionsvektor am C-terminalen Ende des VP22 Gens eingefügt. Im letzten Klonierungsschritt wird am C-terminalen Ende des T-antigen Gens, in der XbaI Stelle, ein Oligonukleotid eingefügt, das 6 Histidinreste (His-Tag) und ein Stopkodon kodiert. Das Endprodukt ist ein Fusionsgen bestehend aus dem VP22 Gen, dem T-antigen und einem His-Tag. Das Fusionsgen wird mit dem CMV Promoter des Expressionsvektors transkribiert und mit dem Translationssignal des Tk-Gens translatiert.

Mit diesem Expressionsvektor werden COS-7 Zellen wie zuvor beschrieben transfiziert (Leonhardt et al., 1992). Das Fusionsprotein wird aufgrund der Transporteigenschaften von VP22 aus den Wirtszellen in das Medium exportiert. Das so konditionierte Kulturmedium der transfizierten COS-Zellen wird kontinuierlich über eine Affinitätssäule (TALON, Clontech, Palo Alto, USA) gepumpt, die Fusionsproteine mit

einem Histidin-Tag spezifisch bindet. Diese Affinitätssäulen werden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Fusionsprotein kann dann spezifisch mit Imidazol eluiert werden und mittels FPLC (Ionenaustauschsäulen) weiter aufgereinigt werden. Das gereinigte Fusionsprotein wird gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und mittels Katether über die Koronararterien direkt in den Herzmuskel appliziert. Alternativ kann das Fusionsprotein direkt und lokal in das ischämische Herzmuskelgewebe injiziert werden.

Literatur

Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88: 223-233.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU et al (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell 71: 865-873

Matthias, P, Müller, M M, Schreiber, E, Rusconi, S and Schaffner, W. (1989) Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. Nucl. Acids Res. 17, 6418.

Patentansprüche

1. Mittel zur Gewebsregeneration, umfassend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, und einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein
2. Mittel zur Gewebsregeneration, umfassend ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein VP22 mit einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein
3. Mittel zur Gewebsregeneration, umfassend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, mit dem SV40 T-Antigen.
4. Mittel nach Anspruch 1, umfassend ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein VP22 mit dem SV40 T-Antigen
5. Mittel nach Anspruch 1, umfassend ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein VP22 mit einem viralen Zyklin
6. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-5 zur Regeneration von infarktgeschädigtem Herzgewebe
7. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-5 zur Regeneration von Nervenzellen
8. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-5 zur Kultivierung von terminal differenzierten Zellen
9. Verwendung des Mittels nach Anspruch 8 zur ex vivo Kultivierung von z. B. Kardiomyozyten mit nachfolgender Re-implantation